

PCT/KR 01/00368
RO/KR 09.03.2001

REC'D 30 MAR 2001

WIPO

PCT

대한민국 특허청

KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 :
Application Number

특허출원 2000년 제 46916 호

출원년월일 :
Date of Application

2000년 08월 14일

출원인 :
Applicant(s)

한국 한의학 연구원

PRIORITY

DOCUMENT

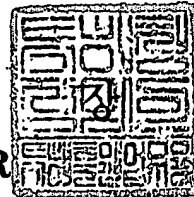
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2001 년 03 월 09 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2000.08.14
【발명의 명칭】	2-(3,4- 디하이드록시페닐)-3,5,7-트리하이드록시-4H-1-벤조 피란-4-온 및 그의 플라보노이드 유도체를 골다공증 예방 및 치료에 사용하는 새로운 용도
【발명의 영문명칭】	Use of 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one and its flavonoid derivateives for the prevention and treatment of osteoporosis
【출원인】	
【성명】	김정숙
【출원인코드】	4-1998-021013-7
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2000-045623-4
【발명자】	
【성명】	김정숙
【출원인코드】	4-1998-021013-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	하혜경
【성명의 영문표기】	HA,Hye-Kyung
【주민등록번호】	730129-2080110
【우편번호】	132-017
【주소】	서울특별시 도봉구 도봉1동 서울가든아파트 1동 408호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	송계용
【성명의 영문표기】	SONG,Kye-Young
【주민등록번호】	481002-1029431
【우편번호】	137-061
【주소】	서울특별시 서초구 방배동 922-6
【국적】	KR

【심사청구】

청구

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
이원희 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 24 면 24,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 3 항 205,000 원

【합계】 258,000 원

【감면사유】 개인 (70%감면)

【감면후 수수료】 77,400 원

【첨부서류】

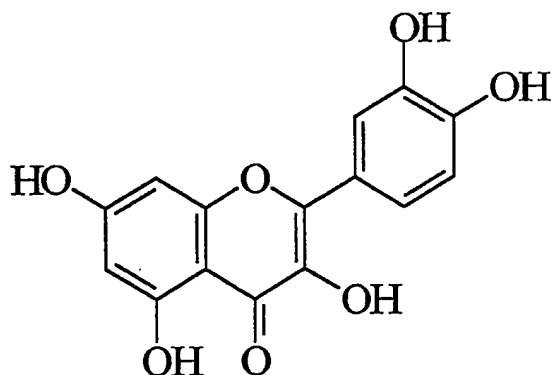
1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5,7-트리하이드록시-4H-1-벤조피란-4-온
 [2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one] 및 그의 플라보노
 이드 (flavonoid) 유도체를 골다공증 예방 및 치료에 사용하는 새로운 용도에 관한 것으
 로서, 구체적으로 하기 화학식 1로 표시되는 2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5,7-트리하이
 드록시-4H-1-벤조피란-4-온 및 그의 플라보노이드 유도체는 조골세포 (osteoblast)의 세
 포증식 촉진효과 및 파골세포 (osteoclast)의 세포증식 억제효과가 뛰어날 뿐만 아니라
 체내 호르몬의 변화 및 조혈기능이나 면역계에 부작용을 유발하지 않아 골다공증 치료제
 또는 예방제 및 건강식품으로도 유용하게 사용될 수 있다.

【화학식 1】



【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5,7-트리하이드록시-4H-1-벤조피란-4-온 및 그의 플라보노이드 유도체를 골다공증 예방 및 치료에 사용하는 새로운 용도{Use of 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one and its flavonoid derivateives for the prevention and treatment of osteoporosis}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5,7-트리하이드록시-4H-1-벤조피란-4-온의 조골세포에서의 세포증식 촉진효과를 MTT 검색법으로 측정하여 제니스테인 (genistein)과 비교한 결과를 나타낸 것이고,

도 2는 2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5,7-트리하이드록시-4H-1-벤조피란-4-온의 조골세포에서의 ALP 활성 증가효과를 제니스테인과 비교한 결과를 나타낸 것이고,

도 3은 2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5,7-트리하이드록시-4H-1-벤조피란-4-온, 에스트라디올 (estradiol), 제니스테인 등의 약물이 투여된 실험동물에서 체중의 변화를 관찰한 결과이고,

도 4는 2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5,7-트리하이드록시-4H-1-벤조피란-4-온, 에스트라디올, 제니스테인 등의 약물이 투여된 실험동물에서 자궁의 무게변화를 관찰한 결과이고,

도 5는 2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5,7-트리하이드록시-4H-1-벤조피란-4-온, 에스

트라디올, 제니스테인 등의 약물이 투여된 실험동물에서 경골 (tibia) 및 요추골 (lumbar)의 소주골 면적의 변화를 관찰한 결과이다.

【발명의 상세한 설명】

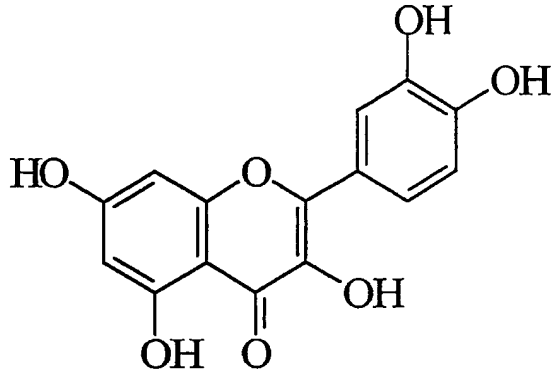
【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<6> 본 발명은 2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5,7-트리하이드록시-4H-1-벤조피란-4-온 [2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one] (이하 '쿠에르세틴 (quercetin)'이라 약칭함) 및 그의 플라보노이드 (flavonoid) 유도체를 골다공증 예방 및 치료에 사용하는 새로운 용도에 관한 것으로서, 구체적으로 하기 화학식 1로 표시되는 쿠에르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체는 조골세포 (osteoblast)의 세포증식 촉진효과 및 파골세포 (osteoclast)의 세포증식 억제효과가 뛰어날 뿐만 아니라 체내 호르몬의 변화 및 조혈기능이나 면역계에 부작용을 유발하지 않아 골다공증 치료제 또는 예방제 및 건강식품으로도 유용하게 사용될 수 있다.

<7> <화학식 1>

<8>



<9> 골다공증 (osteoporosis)은 골 조직의 석회가 감소되어 뼈의 치밀질이 얇어지고 그로 인해 골수강 (骨髓腔)이 넓어지는 상태로, 중세가 진전됨에 따라 뼈가 약해지기 때문에 작은 충격에도 골절되기 쉽다. 골량은 유전적 요인, 영양 섭취, 호르몬의 변화, 운동 및 생활 습관의 차이 등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받으며, 골다공증의 원인으로는 노령, 운동 부족, 저체중, 흡연, 저칼슘 식이, 폐경, 난소 절제 등이 알려져 있다. 한편, 개인차는 있지만 백인보다는 흑인이 골 재흡수 수준 (bone resorption level)이 낮아 골량이 더 높으며, 대개 골량은 14~18세에 가장 높고 노후에는 1년에 약 1%씩 감소한다. 특히, 여성의 경우 30세 이후부터 골 감소가 지속적으로 진행되며, 폐경기에 이르면 호르몬 변화에 의해 골 감소가 급격히 진행된다. 즉, 폐경기에 이르면 에스트로젠 (estrogen) 농도가 급속히 감소하는데, 이 때 IL-7 (interleukin-7)에 의한 것처럼 B-림파구 (B-lymphocyte)가 다량 생성되어 골수 (bone marrow)에 B 세포 전구체 (pre-B cell)가 축적되고 이로 인해 IL-6의 양이 증가하여 파골 세포의 활성을 증가시키므로 결국 골량이 감소하게 된다.

<10> 이와 같이 골다공증은 정도에 차이는 있으나 노년층, 특히 폐경기 이후의 여성에게

있어서는 피할 수 없는 증상으로, 선진국에서는 인구가 노령화됨에 따라 골다공증 및 그 치료제에 대한 관심이 점차 증가되고 있다. 또한, 전세계적으로 골질환 치료와 관련되어 약 1300억 달러의 시장이 형성되어 있는 것으로 알려져 있으며 앞으로 더 증가할 것으로 예상되기 때문에, 세계적인 각 연구 기관과 제약회사에서는 골질환 치료제 개발에 많은 투자를 하고 있다.

<11> 현재 골다공증 치료제로 사용되고 있는 물질로는 에스트로젠 (estrogen), 앤드로제닉 아나볼릭 스테로이드 (androgenic anabolic steroid), 칼슘 제제, 인산염, 불소 제제, 이프리플라본 (ipriflavone), 비타민 D₃ 등이 있다. 또한, 1995년 미국 머크사 (Merck Co.)에서는 아미노비스포스포네이트 (aminobisphosphonate)를, 1997년 미국 릴리사 (Lilly Co.)에서는 선택적인 에스트로젠 수용체 조절기 (selective estrogen receptor modulator, SERM)로서의 역할을 하는 랄록시펜 (raloxifene)을 골다공증에 대한 신약으로 개발한 바 있다.

<12> 한편 종래 골다공증 치료제는 대부분 에스트로젠 계열의 물질로서, 에스트로젠 계열의 물질은 장기 투여할 경우 암, 담석, 혈전증 등의 부작용이 나타나는 것으로 알려져 있다. 그러나, 골다공증은 약물의 단기 투여만으로는 치료할 수 없으며 약물의 장기 투여가 필수적이다. 따라서, 약물을 장기 투여할 때에도 상기와 같은 부작용이 없고 에스트로젠을 대체할 수 있을 만큼 우수한 약효를 갖는 새로운 물질의 개발이 요구되고 있으며, 현재 에스트로젠 대체 물질로 관심의 초점이 되고 있는 것 중의 하나가 대두 이소플라본 (soybean isoflavone) 등의 식물 에스트로젠 (phytoestrogen)이다.

<13> 식물 에스트로젠은 1946년 베네트 등에 의해 최초로 보고되었는데, '클로바 병

(clover disease) [붉은 클로바종 (red clover, *Trifolium subterraneum* var. Dwalganup)에 속하는 식물을 먹은 양에서 불임률이 30% 이상 증가되어, '클로바 병'이라 명명됨]의 원인이 이 식물에 함유된 성분 중 에스트로젠과 유사한 이소플라보노이드 (isoflavonoid)임을 밝히고 식물에서 얻어낸 이러한 화합물을 식물 에스트로젠이라 명명하였다.

<14> 식물 에스트로젠으로 알려진 물질로는 다이드제인 (daidzein), 제니스테인 (genistein), 포르모노네티 (formononetin), 비오카닌 A (biochanin A) 등의 이소플라본 (isoflavanone)류 화합물, 쿠메스트롤 (coumestrol) 등의 쿠메스탄 (coumestan)류 화합물, 엔테롤락톤 (enterolactone) 등의 리그난 (lignan)계 화합물 및 엔테로디올 (enterodiol) 등의 페놀 (phenol)계 화합물이 있다. 이들 식물 에스트로젠은 대개 아글리콘 (aglycone), 6'-O-아세틸글루코시드 (6'-O-acetylglucoside), 6'-O-말로닐글루코시드 (6'-O-malonylglucoside) 등의 형태로 존재하며, 다이드제인과 제니스테인은 7-O-글루코시드 (7-O-glucoside)의 형태로 존재한다. 상기 화합물들 중 당 화합물은 장내 박테리아의 β -글루코시다제 (β -glucosidase) 또는 위산에 의해 가수분해되어, 결국 유리 (free) 이소플라본인 아글리콘의 형태로 흡수되는 것으로 알려져 있다.

<15> 식물 에스트로젠은 일반적으로 동물의 에스트로젠과 유사한 작용을 나타내는데, 에스트로젠 수용체에 결합하여 유방암 세포의 성장을 억제하며 폐경기 이후 나타나는 심혈관 질환 (cardiovascular disease) 및 기타 증상의 치료에 에스트로젠을 대체하여 사용될 수 있다. 또한, 현재 대두 식품을 많이 섭취하는 동양 여자는 미국인에 비해 에스트로젠 부족에 기인하는 골다공증과 심장병의 발현이 적은 것으로 보고되었다 (Y. Ishimi

et al., Selective Effects of Genistein, a Soybean Isoflavone, on B-Lymphopoiesis and Bone Loss Caused by Estrogen Deficiency, *Endocrinol.*, 140(4): 1893-1900, 1999). 이 원인이 식물 에스트로젠인 다이드제인이나 제니스테인의 투여 때문인지 아니면 유전적인 요인인지는 아직 명확히 밝혀져 있지는 않으나, 골다공증 예방 및 치료에 대한 식물 에스트로젠의 유용함을 뒷받침하는 하나의 근거가 되고 있다.

<16> 현재까지의 연구 결과를 토대로 인간 자궁 선암 세포 (human endometrial adenocarcinoma cell)에서 식물 에스트로젠에 의한 ALP 활성을 골다공증 치료제로서 사용되고 있는 에스트라디올 (estradiol)을 기준으로 하여 비교해 보면, 쿠메스트롤 5×10^{-2} 배, 제니스테인과 에콜 (equol) 10^{-3} 배, 다이드제인 7×10^{-3} 배, 비오카닌 A 1.5×10^{-4} 배, 포르모노네티 10⁻⁵배이다. 그러나, 자궁 (uterus)에 미치는 에스트로젠 활성 (estrogenic activity)은 디에틸stil베스트롤 (diethylstilbestrol)을 기준으로 할 때, 쿠메스트롤 3.5×10^{-4} 배, 제니스테인 10^{-5} 배, 다이드제인 7.5×10^{-6} 배, 비오카닌 A 4.6×10^{-6} 배, 포르모노네티 2.6×10^{-6} 배 정도로 상당히 낮았다. 에스트로젠 효과 (estrogenic effect)를 나타내는 양은 쿠메스트롤과 포르모노네티의 경우 각각 알팔파 (alfalfa) 5 g, 9,412 g이고 제니스테인과 다이드제인의 경우 각각 두부 48 g, 145 g이었다. 하지만, 식물 에스트로젠을 사용하는 동물들은 일반적으로 식물 에스트로젠의 혈중 농도가 높기 때문에 불임 등의 문제를 유발할 수도 있으며, 식물 에스트로젠은 항에스트로젠 활성 (anti-estrogenic effect)을 나타내기도 하므로 자궁과 같이 에스트로젠 수용체 (estrogen receptor)의 밀도가 높은 조직이나 장기에는 큰 영향을 미칠 수도 있다.

<17> 한편, 쿼세틴 (quercetin) 은 자연계에 존재하는 4000여종의 식물로부터 얻어지는 페놀계 화합물 (phenolic compound)로서 1936년에 최초로 그 구조가 밝혀진 후 비타민 P (vitamin P)라고도 알려져 있다. 일반적으로 쿼세틴은 식물계 예컨대, 클로바꽃, 돼지풀 꽃가루, 식물의 껍질과 대에 널리 존재하며, 현재까지는 주로 모세관 벽 보전(capillary wall integrity) 및 모세관 저항성(capillary resistance) 유지에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고되고 있다 (Gabor et al., *Progress in Clinical and Biological Research*, 280: 1-15, 1988; Havasteen et al., *Biochemical Pharmacology* 32: 1141-1448, 1983).

<18> 쿼세틴은 통상적으로 당류가 β -결합한 배당체, 즉 루틴 (rutin)으로서 식물계에 널리 분포되어 있는데, 이러한 식물로부터 추출 분리하여 수득한 배당체를 산 또는 효소로 가수분해하여 당을 분리함으로써 제조된다. 쿼세틴은 화학 구조상 큰 공명 구조를 가지고 있고, 황색 착색으로서 산화 방지 작용, 비타민 P 작용, 자외선 흡수 작용 등을 가지고 있으므로 음식물, 의약품 및 화장품 등에 그 응용이 기대되고 있다.

<19> 또한, 쿼세틴은 천연에 다량으로 존재하는 예로서 프로폴리스(propolis)가 있다. 프로폴리스는 문헌 (Maloine Editeur S.A., *Propolis in natural therapeutics*, 1983; *France alc Fragrance Journal*, 83, 36-39, 1987) 등에도 기재되어 있는 바와 같이 꿀벌이 벌집내에 저장하는 수지상의 물질인데, 여기에는 수지, 밀랍, 정유(精油), 화분(花粉), 플라보노이드 등이 함유되어 있어서 옛날부터 여러 가지 민간 요법약으로 이용되어 왔다.

<20> 근래에는 프로폴리스종의 플라보노이드 (flavonoid)가 크리신 (chrysin)등의 플라본 아글리콘 (flavon aglycon)과 갈란긴 (galangin), 쿼세틴 등의 플라본 아글리콘으로

구성되는 플라보노이드를 주성분으로 하고 있음이 판명되어 프로폴리스의 중심적 약효성분으로서 주목받고 있다. 플라보노이드는 주로 먹는 음식에 많이 함유되어 있는데, 미국의 경우 1일 소비량은 약 1g/day로 추정된다. 플라보노이드는 양파: 284-486 mg/kg (Hertog: Lancet 342: 1007-1011 (1993), *J. of Agricultural and food Chem.*, 40: 2379-2383, (1992)), 케일: 110 mg/kg, 프랑스 콩 (french beans): 32-45 mg/kg, 브로콜리 (broccoli): 30 mg/kg, 상치: 14 mg/kg, 토마토: 8 mg/kg 및 사과: 21-72 mg/kg 등에 다량 함유되어 있고 과일에는 평균적으로 15 mg/kg의 플라보노이드가 함유되어 있는 것으로 알려지도 있다.

<21> 플라보노이드의 일반적인 작용은 항고혈압성 (antihypertensive), 항부정맥 활성 (antiarrhythmic activity), 항염증성과 항알레르기성 (anti-inflammatory and anti-allergic properties), 저콜레스테롤혈증 활성(hypocholesterolemic activity), 혈소판과 비만세포 안정화 (platelet and mast cell stabilization), 항간독성 활성 (antihepatotoxic activity), 그리고 항수정능력 (anti-fertility)과 항종양성 (antitumour activity) 활성이 있다.

<22> 특히, 플라보노이드 (flavonoids)는 염증성 질환 (inflammatory)과 혈관 질환 (vascular disease)의 결과로 에이코사노이드 합성 (eicosanoid synthesis)을 변화시킬 뿐만 아니라 혈소판 응고 (platelet aggregation), 저비중 지단백 (low density lipoprotein; LDL) 산화, 혈관확장 (vasodilation)에 대한 효과도 알려져 있다. 또한, DNA (deoxyribo nucleic acid) 및 RNA (ribonucleic acid) 중합효소(polymerase)의 활성을 억제하여 항바이러스성 활성(antiviral activity)도 나타낸다. 그 외에도, 플라보노이드는 돌연변이 활성 (mutagenic activity), 비발암성 활성 (non-carcinogenic

activity)을 나타내며 생체내 흡수도가 0.3 ~ 0.5%로 상당히 낮아서 장기간 투여할 경우 대사상의 불활성으로 인하여 발암성 활성 (carcinogenic activity)이 억제되어 세뇨관 상피 (renal tubular epithelium)에서 악성 종양이 발견된 경우도 있다(Zhu J., , 269: 292-299, 1994).

<23> 또한, 쿠에르세틴은 칼슘 2가 이온 (Ca^{2+})에 의존하는 삼인산 아데노신 (adenosine triphosphate; ATP) 효소의 활성을 억제하므로 수정능력을 감소시키는 활성이 있다 (Hammerstedt, *Arch. Biochem. Biophys.*, 266: 111-123, 1988). 그리고, 쿠에르세틴은 임신한 나귀의 혈청 고나도트로핀 (gonadotropin)이 어린 쥐의 난소와 자궁의 성장에 미치는 영향을 억제한다고 보고되었는데 (Gumbinger, *Progress in Clinical and Biological Research*, 280: 345-348, 1988), 고나도트로핀은 장기간 투여할 경우 골다공증을 유발한다고 알려진 물질이다.

<24> 그러나, 아직까지 골다공증 예방 또는 치료와 관련하여 쿠에르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체를 사용한 예는 보고된 바 없다.

<25> 이에 본 발명자들은 골다공증 예방 또는 치료제로 사용할 수 있는 대체물질을 찾고자 노력하던 중 프로폴리스 종의 플라보노이드를 주성분으로 하고 있는 쿠에르세틴이 조골세포의 세포증식을 촉진하고 파골세포의 세포증식을 억제하는 활성이 우수한 것을 확인하고 쿠에르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체를 골다공증 치료제 또는 예방제로 사용

할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <26> 본 발명의 목적은 쿼르세틴 (quercetin) 및 그의 플라보노이드 (flavonoid) 유도체를 골다공증 예방제 또는 치료제 및 건강식품으로 사용하는 새로운 용도를 제공하는 것이다.

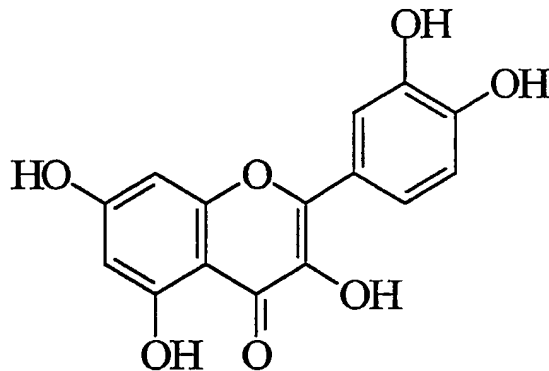
【발명의 구성 및 작용】

- <27> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 골다공증 예방 및 치료 효과를 나타내는 쿼르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체를 제공한다.
- <28> 또한, 본 발명은 상기 쿼르세틴, 그의 플라보노이드 유도체 및 약학적으로 허용되는 그의 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 제공한다.
- <29> 아울러, 본 발명은 쿼르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체를 골다공증 예방제 및 치료제로 사용하는 용도를 제공한다.
- <30> 마지막으로, 본 발명은 쿼르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체를 건강식품으로 이용하는 용도를 제공한다.
- <31> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <32> 본 발명은 골다공증 예방 및 치료 효과를 나타내는 쿼르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체를 제공한다.

- <33> 쿠에르세틴은 하기 화학식 1로 나타내며 2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5,7-트리하이드록시-4H-1-벤조피란-4-온 [2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one] 또는 3,3',4',5,7-펜타하이드록시플라본 (3,3',4',5,7-pentahydroxy-flavone) 으로서 $C_{15}H_{10}O_7$ 의 분자식과 302.33 g/mole의 분자량을 갖는 식물 에스트로겐의 일종이다.

<36> <화학식 1>

<37>



- <38> 상기 쿠에르세틴은 종래 골다공증 치료제로 주로 사용되고 있던 제니스테인과 비교해 보면, 조골세포의 세포증식 촉진효과 및 파골세포의 세포증식 억제효과가 뛰어날 뿐만 아니라 부작용이 적고, 체내 호르몬의 변화를 크게 유발하지 않으며 조혈기능이나 면역계에 영향을 미치지 않는 안전한 약물로서, 골다공증 치료제 또는 예방제로서 유용하게 사용될 수 있다.

- <39> 본 발명자들은 쿠에르세틴이 조골세포 (osteoblast) 및 파골세포 (osteoclast)의

세포증식에 미치는 효과를 검색하기 위하여 식물 에스트로젠 (phytoestrogen)의 일종으로 현재 골다공증 치료제로 많이 연구되어지는 제니스테인 (genistein)을 비교물질로 하여 세포증식에 미치는 효과를 검사한 결과, 쿠에르세틴은 제니스테인보다 조골세포의 세포증식 촉진효과 및 ALP 활성 증가효과가 뛰어나며 파골세포의 세포증식 억제효과 역시 우수하여 골다공증 치료제의 이상적인 약물임을 확인하였다.

<40> 또한 난소적출 흰쥐에 대한 동물 실험 결과, 쿠에르세틴의 투여가 체내 호르몬의 변화를 크게 유발시키지 않으며, 현재 골다공증의 치료제로 사용되고 있는 에스트라디올이 자궁비대 등의 부작용이 있는 반면 쿠에르세틴은 에스트라디올과 같은 부작용이 나타나지 않는 안전한 약물임을 확인하였다. 아울러, 쿠에르세틴은 소주골의 면적변화가 많은 경골에서 에스트라디올보다 소주골의 면적 증가효과가 높게 나타났으며, 조혈기능이나 면역계에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 확인되어 본 발명에 의한 쿠에르세틴이 골다공증의 예방 및 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

<41> 또한, 본 발명은 쿠에르세틴, 그의 플라보노이드 유도체 및 약학적으로 허용되는 그의 염을 유효성분으로 함유하는 골다공증 치료제 또는 예방제용 약학적 조성물을 제공한다.

<42> 상기 쿠에르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체는 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

<43> 즉, 본 발명의 쿠에르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체는 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하

는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 쿠에르세틴에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 또한 골다공증 예방 및 치료제로서의 효능 증진을 위해 칼슘이나 비타민 D₃를 첨가할 수 있다.

<44> 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식에 의한다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 상기 화학식 1의 화합물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제한다.

<45> 투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배로, 또는 1/2, 1/3 또는

1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 바람직하기로는 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다.

<46> 쿠에르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체의 유효용량은 5 ~ 70 mg/kg이고, 바람직하기로는 10 ~ 50 mg/kg이며, 하루 1 ~ 3 회 투여될 수 있다.

<47> 본 발명의 쿠에르세틴을 마우스에 경구 투여시 및 복강내 투여시의 독성 실험을 수행한 결과, 경구 독성시험에 의한 50 % 치사량 (LD₅₀)은 적어도 160 mg/kg 이상인 것으로 나타났다 (M. Sullivan *et al. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 77: 269, 1951).

<48> 아울러, 본 발명에서는 상기 쿠에르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체를 유효 성분으로 함유하는 건강식품을 제공한다.

<49> 이 때, 쿠에르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체를 함유하는 건강식품으로는 쿠에르세틴을 유효성분으로 한 차, 젤리, 즙, 주스, 액기스, 음료 등의 골다공증 예방, 항암 등을 목적으로 하는 민간요법제 등을 들 수 있다.

<50> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<51> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<52> <실시예 1> 조골세포의 세포증식효과

<53> 본 발명에서는 쿠에르세틴이 조골세포 (osteoblast)의 세포증식에 미치는 효과를 검색하기 위하여 사람의 유사조골세포주 (human osteoblast-like cell line)인 Saos-2 세포를 사용하여 효과를 검색하였고, 식물 에스트로젠 (phytoestrogen)의 일종으로 현재 골다공증 치료제로 많이 연구되어지는 제니스테인 (genistein)을 비교물질로 하여 조골 세포의 세포증식에 미치는 효과를 검색하였다.

<54> <1-1> 조골세포의 선별 및 세포 배양

<55> 뼈의 구성 성분인 조골세포와 유사한 성질을 나타내는 Saos-2 세포주를 서울대학교 의과대학 암 연구소의 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

<56> Saos-2 세포는 10% FBS, 페니실린 100 유닛/ml, 스트렙토마이신 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 포함하는 RPMI 1640배지 (Gibco BRL, 미국)를 사용하여 습식 조건, 37°C로 5% CO₂ 배양기 (incubator)에서 배양하였다. 배지는 1주일에 2~3회 교환하였고 1주일에 1회 계대배양 하였다. 상기 세포주는 배양 플라스크에 단일층 (monolayer)을 형성하며 자라는 특성이 있기 때문에, 계대배양 시에는 0.25% 트립신 (trypsin) 용액을 사용하여 단일층을 벗겨 내었다.

<57> <1-2> 약물의 농도에 따른 세포증식실험: MTT 실험

<58> 상기 세포주를 96-웰 플레이트에 20,000 세포수/웰로 접종하고 쿠에르세틴을 10^{-2} ~ 10^{-9} mg/ml의 농도가 되도록 각 농도별로 6개의 웰에 첨가하였다. 쿠에르세틴을 용해 시키기 위한 용매로는 DMSO (dimethylsulfoxide)를 사용하였고, 배양조건에서 DMSO의 최

중농도는 1%가 되도록 하였다. 한편 대조군으로는 쿠에르세틴을 첨가하지 않은 것을 사용하였고, 비교군으로는 현재 골다공증 치료제로 주로 연구되고 있는 제니스테인을 농도 별로 웰에 첨가하여 사용하였다.

<59> 상기에서 준비된 것을 37℃ 배양기에서 3일간 배양하고, 여기에 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Triazolyl Blue)를 0.05 mg/ml 농도로 가하여 동일한 조건에서 4시간 더 배양하였다. MTT 분석법은 살아있는 세포수에 비례하여 노란색의 MTT가 자주색의 포르마잔 (formazan) 결정으로 변화되는 것을 이용하여 생성된 포르마잔 결정을 분광광도법으로 측정하여 살아있는 세포의 수를 측정하는 분석방법이다. 생성된 포르마잔 결정을 DMSO로 용해시켜 엘리자 리더 (ELISA reader)로 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

<60> 세포 증식율 (%)은 하기 수학적 1과 같이, 쿠에르세틴을 첨가하지 않은 대조군 웰의 흡광도에 대한 쿠에르세틴 첨가 웰의 흡광도의 비로서 계산하였으며, 쿠에르세틴을 동일한 농도로 처리한 6개 웰의 값을 평균하였다.

<61> <수학적 1>

<62>

$$\text{세포증식율(\%)} = \frac{(\text{쿠에르세틴 첨가웰의 OD}_{550\text{nm}} \text{ 평균값}) - (\text{빈웰의 OD}_{550\text{nm}} \text{ 평균값})}{(\text{대조군웰의 OD}_{550\text{nm}} \text{ 평균값}) - (\text{빈웰의 OD}_{550\text{nm}} \text{ 평균값})} \times 100$$

<63> 그 결과, 쿠에르세틴에 의한 조골세포 증식률 (%)을 하기 표 1에 나타내었다.

<64> <1-3> ALP 활성 검색

<65> 조골세포는 세포 특이적으로 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase, 이하 'ALP'라 약칭함) 활성을 나타내므로, 본 발명에 의한 쿠에르세틴이 조골세포에서 ALP 활성에 미치는 영향을 하기와 같은 방법에 의해 알아 보았다.

<66> MTT 실험에서와 동일한 세포수의 Saos-2 세포주에 시험 물질을 동일한 농도로 처리하고 동일한 조건에서 3일간 배양 후 수확하였다. 이 때, 비교군으로는 제니스테인을 사용하였다. 한편, ALP가 p-니트로페닐포스페이트 (p-nitrophenylphosphate)를 p-니트로페놀 (p-nitrophenol)과 포스페이트 (phosphate)로 분해시키는 것을 이용하여 405 nm에서의 흡광도의 변화를 분석하여 ALP 활성을 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

<67> <표 1> 쿠에르세틴에 의한 조골세포의 세포증식효과

<68>

농도 (mg/ml)	쿠에르세틴 (대조군의 %)		제니스테인 (대조군의 %)	
	MTT 검색법	ALP 활성	MTT 검색법	ALP 활성
대조군	100.0 ±2.5	100.0 ±1.6	100.0 ±0.6	100.0 ±7.3
1 ×10 ⁻⁹	93.1 ±0.8*	98.1 ±0.0	91.3 ±0.6*	106.1 ±6.4
1 ×10 ⁻⁸	93.9 ±0.8	104.4 ±3.9	96.9 ±2.7	101.5 ±3.8
1 ×10 ⁻⁷	98.6 ±1.0	101.2 ±3.1	95.9 ±1.6	109.3 ±9.6
1 ×10 ⁻⁶	96.0 ±1.0	127.2 ±3.5**	90.5 ±0.9**	103.8 ±3.7
1 ×10 ⁻⁵	95.8 ±1.1	116.5 ±3.7	97.3 ±1.6	113.5 ±7.3
1 ×10 ⁻⁴	96.5 ±0.8	113.5 ±2.3	95.7 ±0.7	121.1 ±6.2
1 ×10 ⁻³	98.3 ±0.8	107.3 ±1.5	85.5 ±1.1**	98.8 ±6.9
1 ×10 ⁻²	108.6 ±2.2**	106.1 ±4.3	66.2 ±2.8**	62.3 ±3.4

본페로니 다중 비교 방법 (Bonferroni multiple comparison method)에 의해 대조군과 비교, *, p<0.05, **, p<0.01

<69> 상기 표 1에서 볼 수 있듯이, MTT 검색법을 통한 세포증식 실험에서 쿠에르세틴은 에서 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-3}$ mg/ml 농도에서는 약물을 처리하지 않은 대조군과 세포증식효과에 별다른 차이가 없는 것으로 나타났으나, 1×10^{-2} mg/ml의 농도에서는 대조군의 약 109%에 해당하는 최대 세포증식효과를 나타냈었다 ($p < 0.01$). 또한, ALP 활성을 조사한 결과, 쿠에르세틴은 1×10^{-6} mg/ml 농도에서 대조군의 127%로 최대 ALP 활성을 나타내었다 ($p < 0.01$). 비교 물질로 사용한 제니스테인은 MTT 검색에서 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-2}$ mg/ml의 농도로 처리하였을 경우 1×10^{-9} mg/ml 농도에서 대조군의 91% ($p < 0.05$), 1×10^{-6} mg/ml 농도에서 90.5% ($p < 0.01$), 1×10^{-3} mg/ml 농도에서 86% ($p < 0.01$) 그리고 1×10^{-2} mg/ml 농도에서 66% ($p < 0.01$)로 나타나 조골세포의 세포증식을 촉진하는 효과를 나타내기 보다는 오히려 조골세포의 세포증식을 억제하는 효과를 나타냈었다. 반면, 제니스테인의 ALP 활성검색 결과, 제니스테인은 1×10^{-4} mg/ml 농도에서 대조군의 121%로 ALP 활성효과는 있는 것으로 나타났다.

<70> 따라서, 현재 연구가 진행중인 제니스테인보다 쿠에르세틴이 조골세포의 세포증식 촉진 효과 및 ALP 활성 증가효과가 뛰어남을 알 수 있다.

<71> <실시예 2> 파골세포의 세포증식효과

<72> 본 발명에 의한 쿠에르세틴의 파골세포 (osteoclast)의 증식 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 실시하였다.

<73> <2-1> 파골세포의 선별 및 세포 배양

<74> ICR 마우스 (한국화학연구소, 대전)에 4주간 칼슘-결핍 식이 (ICN Biomedicals, Inc., Ohio, U.S.A.)를 제공하여 파골세포의 활성을 증가시켰다. 이러한 마우스의 좌우 경골과 대퇴골을 주위의 근육조직 없이 깨끗이 떼어 낸 후 클린 벤치로 옮기고, 대퇴골과 좌우 경골을 세분하여 미리 얼음에 넣어 두었던 페니실린 100 유닛/ml와 스트렙토마이신 100 μ g/ml을 함유하는 α -MEM에 넣어 1분간 강하게 진탕하여 파골세포가 배지로 분리되어 나오게 하였다. 이를 얼음에 5분간 방치한 후 세포 부유액을 800 g에서 3분간 원심 분리하였고 침전된 세포를 페니실린 100 유닛/ml와 스트렙토마이신 100 μ g/ml 및 10% FBS를 함유하는 α -MEM의 배양배지에 부유시켰다. 배양배지에 부유시킨 세포를 24-웰 플레이트에 3.5×10^6 세포수/웰 만큼씩 분주한 후 약물처리를 하였다.

<75> <2-2> 약물의 농도에 따른 세포 증식 실험

<76> 상기 실시예 <2-1>에서 직접 분리한 파골세포에 쿠에르세틴을 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-2}$ mg/ml 농도로 첨가하였다. 약물을 가한지 2일째에 TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase) 염색 (staining)을 실시하였다. 파골세포의 수는 TRAP을 발현하는 다핵 세포 (multinucleated cell)의 수를 세어 측정하였다. 염색은 시판되는 키트 (kit) (Sigma사, 미국)를 사용하였으며, TRAP 염색에 의하여 붉은 색을 띄게되는 3 개 이상의 핵을 갖는 TRAP-양성 세포 (TRAP-positive MNC)를 파골세포로 판정하여 그 수를 측정하였다. 실험결과 나타난 파골세포의 세포증식효과를 하기 표 2에 나타내었다.

<77> <표 2> 쿠에르세틴에 의한 파골세포의 세포증식효과

<78>

농도 (mg/ml)	파골세포의 수 (대조군의 %)
대조군	100.0±3.1
1×10^{-8}	100.9±1.8
1×10^{-6}	96.8±2.7
1×10^{-4}	89.6±3.2
1×10^{-3}	61.1±4.1*
1×10^{-2}	24.7±5.7**
본페로니 다중 비교 방법으로 대조군과 비교, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$	

<79> 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 쿠에르세틴의 농도가 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-4}$ mg/ml 일 경우에는 파골세포의 세포증식 억제효과가 크지 않았으나 1×10^{-3} mg/ml 농도에서는 대조군의 61% ($p < 0.05$), 1×10^{-2} mg/ml 농도에서는 대조군의 25% ($p < 0.01$)로 세포증식이 억제되어 쿠에르세틴이 파골세포의 세포증식을 현저하게 억제하였다.

<80> 상기 실시예 1 및 실시예 2의 결과로 미루어, 쿠에르세틴은 1×10^{-2} mg/ml 농도에서 조골세포의 세포증식을 대조군에 비하여 약 109%로 촉진하는 효과를 나타내었고 ($p < 0.01$), 파골세포의 세포증식을 대조군에 비하여 25% ($p < 0.01$)로 억제하는 효과를 나타내었다. 따라서, 쿠에르세틴은 1×10^{-2} mg/ml 농도에서 조골세포의 세포증식 촉진효과 및 파골세포의 세포증식 억제효과를 모두 나타내는 골다공증 치료제의 이상적인 약물임을 확인하였다.

<81> <실시에 3> 난소적출 흰쥐에 대한 동물 실험

<82> 폐경기 이후 타입 I (type I) 골다공증이 일어나는 SD (Sprague-Dawley)계 흰쥐의 암컷을 대상으로 하여 골다공증에 대한 동물 실험을 실시하였다.

<83> <3-1> 실험 동물 및 실험 단계

<84> 실험 재료로는 한국화학연구소에서 분양받은 생후 10주된 체중 200~300 g 정도의 암컷 흰쥐 (Sprague Dawley rat)를 사용하였다. 실험 과정은 크게 흰쥐의 난소 적출술의 시행, 각 군에 따른 약물 투여, 적출술 후 일정 기간 마다 쥐를 희생하여 체중변화, 체내 장기조직 관찰, 소주골 면적의 변화, 전혈구수 및 혈장의 생화학적 검사으로 나누어 실험을 수행하였다.

<85> <3-2> 난소 적출술 및 약물 투여

<86> 난소 적출술은 sham군 (정상군)을 제외하고 대조군과 시험군의 모든 흰쥐 암컷에서 양측 난소 적출술을 시행하였다. 케타민 (ketamine) (유한양행, 대한민국) 5 mg/100 g 과 자일라진 (xylazine) (한국 바이엘, 대한민국) 1 mg/100 g을 흰쥐의 좌측 및 우측 후지 대퇴근에 근육 주사하여 흰쥐 암컷을 전신 마취시켰다. 하복부의 털을 제거하고 동물의 체위를 반듯이 놓힌 상태에서 포타딘액 (삼일제약: 요오드, 대한민국)으로 수술 부위를 소독한 후, 무균 조작 하에서 수술을 시행하였다. 정중선 (백선)을 중심으로 하복부에서 2 cm 정도로 피부, 복근 및 복막을 절개하고, 소독된 핀셋으로 난소를 노출시켜 난관을 전사로 결찰한 후 좌우 난소를 적출하였다. 항생제 (셀파포르테-4, 유니화학 주

식회사) 0.3 ml를 복강 내에 주입하여 감염을 방지하였으며, 전사 및 나일론사로 복막, 복근 및 피부를 봉합하였다.

<87> Sham군은 난소 적출을 제외한 모든 수술을 행한 동물들로 난소를 적출하고 약물 투여를 하지 않은 대조군에 대한 비교군으로 난소 적출로 인한 변화를 대조군과 비교하기 위하여 존재한다. 반면에 대조군은 난소 적출술을 행하고 약물 투여를 실시한 투여군들의 동물들과 비교하여 약물 투여에 기인하는 변화를 비교하기 위한 것이다.

<88> 약물 투여시, 약물 투여 전후 일정 기간 동안 (난소 적출 전, 적출 후, 투여1~9주 동안) 혈액을 미정맥 내에서 카테타 (B.D사 : 24G)를 이용하여 1.5 ml 채취 (heparin : 75IU)하고 전혈구수 측정 (Coulter사 : JT) 및 혈장의 생화학적 검사 (Crony사 : 에어론200)를 실시하였으며, 부검시 후대 정맥에서 채혈하여 상기와 같은 분석을 실시한 후 대퇴골 내의 소주골 면적의 변화 및 체내 장기 조직의 관찰을 위해 각 시료들을 냉동 보관하였다.

<89> 난소를 적출하고 나서 1주 후부터 Sham군과 대조군은 10% Tween 80 용액을, E2군은 17 β -에스트라디올을 1 μ g/kg/day로, 시험 약물 투여군은 시험 약물로 쿠에르세틴 및 제니스테인을 각각 10 mg/kg/day 농도로 9주 동안 복강 주사하여 동물 실험을 실시하였다. 10주령에서 20주령까지 매주 각군의 체중 변화를 측정하였다. 투여 후 1주일에 1회씩 채혈하고, 9주 동안 투여한 뒤에는 가능한 한 혈액 전량을 헤파린으로 처리하여 취한 뒤 CBC (Complete Blood Count) 검사를 행하고 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈장을 취한 후 다음 실험까지 -70℃에서 냉동 보관하였다. 또한, 골밀도 검사를 위해 5, 6번 요추골 (lumbar), 오른쪽 경골 (tibia)을 분리하고 4% 포르말린 (formalin) 용액 (10% 희석액)에 보관하였다..

<90> <실험에 1> 쿠에르세틴의 투여에 따른 체중변화

<91> 상기 <3-2>와 같이 Sham군, 17 β -에스트라디올이 처리된 E2군, 쿠에르세틴 및 제니스테인이 각각 처리된 시험 약물군의 체중을 약물투여 후 10주령에서 20주령까지 매주 측정하고 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

<92> <표 3> 약물투여에 따른 체중변화 측정

<93> 체중 (g)	대조군	Sham	E2	쿠에르세틴	제니스테인
수령	219.39 \pm 4.05	220.70 \pm 4.63	228.51 \pm 8.11	221.87 \pm 7.57	217.55 \pm 7.24
11	244.98 \pm 3.00	231.51 \pm 4.68	249.50 \pm 8.16	241.73 \pm 4.83	242.12 \pm 5.96
12	274.29 \pm 3.68 **	236.40 \pm 5.06##	264.97 \pm 8.35	271.70 \pm 5.79 **	270.00 \pm 8.05**
13	299.37 \pm 3.74 **	245.56 \pm 4.79 ###	279.87 \pm 8.15 **	295.00 \pm 3.89 **	296.20 \pm 7.68**
14	315.20 \pm 3.84 **	248.96 \pm 5.02 ###	292.83 \pm 9.25 **	312.07 \pm 5.95 **	310.80 \pm 7.80**
15	320.30 \pm 4.83 **	255.43 \pm 5.14 ####	296.96 \pm 9.44 **	320.25 \pm 6.76 **	317.29 \pm 7.93**
16	329.03 \pm 5.05 **	261.49 \pm 6.46 ####	304.49 \pm 8.40 **	326.68 \pm 6.73 **	327.19 \pm 8.31**
17	337.39 \pm 5.93 **	264.78 \pm 5.53 ####	313.04 \pm 8.73 **	333.25 \pm 7.61 **	332.80 \pm 9.23**
18	340.01 \pm 6.60 **	268.16 \pm 5.40 ####	315.87 \pm 8.32 **	335.09 \pm 6.65 **	336.38 \pm 9.01**
19	347.96 \pm 7.58 **	273.81 \pm 4.54 ####	319.95 \pm 9.47 **	343.02 \pm 6.96 **	342.71 \pm 8.26**
20	356.73 \pm 7.13 **	275.22 \pm 4.30 ####	320.00 \pm 5.90 ###	346.27 \pm 6.39 **	347.23 \pm 7.57**
10주는 수술전, 11주는 약물투여 시작. 본페로니 다중 비교 방법으로 10주와 비교, *; p<0.05, **; p<0.01 본페로니 다중 비교 방법으로 대조군과 비교, #; p<0.05, ##; p<0.01					

<94> 상기 표 3에 나타낸 바와 같이, Sham군은 수술 후 3주 ($p<0.05$)부터 수술전과 비교하여 체중이 증가하기 시작하였고, 대조군은 수술후 2주 ($p<0.01$)부터 체중이 증가되었다. 대조군은 Sham군에 비해 급격한 체중의 증가를 나타내었는데, 이러한 체중의 증가는 E2의 $1 \mu\text{g/kg/day}$ 의 투여로 둔화되어 E2군의 20주령에서는 대조군과 비교하여 낮은 체중 증가를 보였다 ($p<0.05$). 하지만, 식물 에스트로젠의 일종인 쿠에르세틴과 제니스테인이 10 mg/kg/day 농도로 투여된 시험 약물군에서는 난소적출 후에도 대조군과 유사하게 급격한 체중증가를 나타내었다 (도 3). 이러한 결과는 쿠에르세틴의 투여가 체내 호르몬의 변화를 크게 유발시키지는 않는 것임을 나타낸다.

<95> <실험예 2> 쿠에르세틴의 체내 장기조직에 미치는 영향

<96> 실험동물에 투여된 쿠에르세틴이 체내 장기조직에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 수술후 9주간 약물을 투여한 실험동물로부터 간 (liver), 신장 (kidney), 뇌 (brain), 자궁 (uterus), 피부 (skin), 경골 (tibia)을 적출하여 각각의 무게 (wet weigh)를 측정하였다. 그 결과를 하기 표 4에 나타내었고, 투여약물에 따른 자궁의 무게변화를 도 4에 나타내었다.

<97> <표 4> 약물투여 후 체내 장기조직의 무게변화 (wet weigh)

<98>

	대조군	Sham	E2	쿠에르세틴	제니스테인
간 (g)	9.84 \pm 0.33	9.52 \pm 0.48	9.22 \pm 0.43	9.07 \pm 0.30	10.03 \pm 0.36
신장(g)	1.95 \pm 0.09	1.91 \pm 0.05	1.85 \pm 0.09	1.84 \pm 0.05	1.83 \pm 0.03
뇌 (g)	2.03 \pm 0.04	1.93 \pm 0.02	1.98 \pm 0.05	1.98 \pm 0.04	1.98 \pm 0.03
경골 (g)	0.559 \pm 0.025	0.514 \pm 0.013	0.504 \pm 0.019	0.554 \pm 0.019	0.537 \pm 0.008
피부 (mg)	193 \pm 7	169 \pm 8	193 \pm 6	197 \pm 11	188 \pm 9
자궁 (mg)	79 \pm 4	450 \pm 29**	279 \pm 10**	85 \pm 6	106 \pm 8
본페로니 다중 비교 방법으로 대조군과 비교, **, p<0.01					

<99> 상기 표 4에서 볼 수 있듯이, 간, 신장, 뇌, 경골 및 피부의 무게는 정상대조군인 Sham 군과 난소적출 대조군 및 약물투여군 모두에서 차이를 나타내지 않았으나, 난소에서 분비되는 에스트로젠에 의해 영향을 받는 자궁의 무게는 Sham 군에 비해 난소적출 대조군에서 크게 감소되었고 ($p<0.01$), 난소적출 후 E2의 투여는 이러한 자궁의 퇴화를 억제하였다 (대조군과 비교하여 $p<0.01$). 하지만, 식물 에스트로젠인 쿠에르세틴과 제니스테인의 투여는 자궁의 무게를 변화시키지 않는 것으로 나타났다. 즉, E2는 현재 골다공증의 치료제로 사용되고 있지만 자궁비대 등의 부작용이 있는 반면 쿠에르세틴은 E2와 같은 부작용이 나타나지 않는 안전한 약물로 사료된다.

<100> <실험예 3> 약물투여에 따른 소주골 면적(trabecular bone area; TBA)의 변화

<101> 9주 동안 약물을 투여한 각 군으로부터 적출된 요추골 (lumbar) 및 경골 (tibia)에서의 소주골의 면적을 하기와 같은 방법에 의해 측정하였다.

<102> 정량적 영상 분석기 (Quantitative image analysis system, Wild Leitz Co.)의 디지털화 장치 (digitizer)로 각 소주의 윤곽선을 따라 그려 컴퓨터 화면에 영상을 얻고 특수한 컴퓨터 체계를 이용하여 이 영상의 면적을 자동적으로 계산하고 이것으로 소주골

(trabecula)의 면적을 구하였다. 각 경골의 근위부에서 성장판의 직하부의 부분 중 가로변의 길이가 성장판 길이의 약 2/3정도 되는 길이로 기준 면적 $2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ 인 직사각형의 내부에 있는 소주골들의 평균 면적을 컴퓨터를 이용하여 구하고, 그 직사각형 내부의 소주골의 갯수를 구한 다음 평균 면적에 갯수를 곱하여 각각의 골 표본의 소주골 면적을 구한 후 통계 처리하였다. 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

<103> <표 5> 약물투여에 따른 경골의 소주골 면적 (TBA)의 변화

<104>

	TBA ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)	대조군의 %
대조군	34.62 \pm 2.62	100.00 \pm 5.55
Sham	85.55 \pm 5.31**	247.07 \pm 15.33**
E2	51.40 \pm 2.28	148.46 \pm 6.59
쿠에르세틴	55.52 \pm 7.68*	160.34 \pm 22.17*
제니스테인	47.65 \pm 2.07	137.62 \pm 5.98
본페로니 다중 비교 방법으로 대조군과 비교, *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$		

<105> 상기 표 5에 나타낸 바와 같이, 경골의 경우 대조군은 $34.62 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 으로 정상군인 Sham군의 $85.55 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 에 비해 크게 감소되어 ($p < 0.01$) 골다공증이 유발되어있음을 알 수 있었고, 이러한 소주골의 감소는 E2, 쿠에르세틴 및 제니스테인으로 인해 각각 대조군의 148%, 160% 및 138%로 소주골 면적이 증가하는 경향이 있었으나 쿠에르세틴의 10 mg/kg/day의 투여군만 의미있는 소주골 면적의 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$).

<106> 상기과 동일한 측정방법을 이용하여 실험동물에 9주간의 약물투여 후 적출한 요추골 (lumbar)에서의 소주골의 면적을 측정한 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

<107> <표 6> 약물 투여에 따른 요추골의 소주골 면적 (TBA)의 변화

<108>

	TBA ($\times 10^4 \mu m^2$)	대조군의 %
대조군	67.53 \pm 2.31	100.00 \pm 3.42
Sham	93.70 \pm 5.29**	138.76 \pm 7.84**
E2	89.16 \pm 2.83**	132.04 \pm 4.19**
쿠에르세틴	87.38 \pm 4.53*	129.40 \pm 6.71*
제니스테인	86.58 \pm 3.00*	128.23 \pm 4.45*
본페로니 다중 비교 방법으로 대조군과 비교, *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$		

<109> 상기 표 6에서 볼 수 있듯이, 요추골의 경우 대조군은 $67.53 \times 10^4 \mu m^2$ 으로 Sham군의 $93.70 \times 10^4 \mu m^2$ 에 비해 감소되어 있었으나 ($p < 0.01$) E2, 쿠에르세틴 및 제니스테인의 투여로 각각 대조군의 132% ($p < 0.01$), 129% ($p < 0.05$) 및 128% ($p < 0.05$)로 증가되어 난소적출로 유발된 소주골 면적의 감소를 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 특히, 쿠에르세틴은 소주골의 면적변화가 많은 경골에서 현재 치료제로 사용되는 E2보다 소주골의 면적 증가효과가 높게 나타났으며, E2의 부작용인 자궁의 비대 현상도 나타나지 않았으므로 골다공증 치료제로서 쿠에르세틴이 E2보다 더 효과적이라고 사료된다. 상기 표 5 및 표 6에서 살펴본 약물투여에 따른 경골(tibia) 및 요추골(lumbar)의 소주골 면적의 변화를 도 5에 나타내었다.

<110> <실험예 4> 전혈구수 (complement blood cell; CBC)의 측정

<111> 체내의 상태 및 이상현상을 그대로 반영하는 혈액의 전혈구수를 측정하여 약물투여에

의한 실험동물의 이상여부를 판명하였다. 먼저, 조혈기능의 이상 유무를 알 수 있는 적혈구 (red blood cell; RBC), 혈색소 (hemoglobin; Hb) 및 적혈구 용적비 (hematocrit; Ht)를 측정하고 그 결과를 표 7에 나타내었다.

<112> <표 7> 약물투여에 따른 전혈구수의 변화

<113>

	주령	대조군	Sham	E2	쿠에르세틴	제니스테인
적혈구 ($\times 10^6$ cells/ μ l)	10	7.36 \pm 0.11	7.19 \pm 0.11	7.33 \pm 0.13	7.29 \pm 0.15	7.32 \pm 0.13
	20	7.08 \pm 0.09	6.75 \pm 0.24	6.97 \pm 0.14	7.13 \pm 0.15	7.17 \pm 0.13
혈색소 (g/dl)	10	16.09 \pm 0.21	15.75 \pm 0.20	15.86 \pm 0.24	16.00 \pm 0.30	15.82 \pm 0.27
	20	14.58 \pm 0.20	14.09 \pm 0.48	14.34 \pm 0.29	14.84 \pm 0.22*	14.70 \pm 0.22
적혈구용적비 (%)	10	43.34 \pm 0.48	43.09 \pm 0.61	43.11 \pm 0.55	43.62 \pm 0.83	42.76 \pm 0.65
	20	39.48 \pm 0.60	38.39 \pm 1.24	38.86 \pm 0.72	41.10 \pm 0.68*	40.66 \pm 0.56*
백혈구 ($\times 10^3$ cells/ μ l)	10	26.13 \pm 4.63	25.61 \pm 3.64	23.14 \pm 1.50	20.28 \pm 3.77	27.30 \pm 4.85
	20	21.66 \pm 2.89	12.74 \pm 2.88*	13.26 \pm 0.97	18.50 \pm 7.60	21.50 \pm 2.53
림프구 ($\times 10^3$ cells/ μ l)	10	22.14 \pm 4.49	18.04 \pm 2.38	17.80 \pm 1.72	16.78 \pm 3.52	19.68 \pm 4.52
	20	21.20 \pm 9.00	10.20 \pm 2.88	10.23 \pm 0.96	15.00 \pm 7.71	15.25 \pm 3.21
단핵구 ($\times 10^3$ cells/ μ l)	10	1.02 \pm 0.18	0.73 \pm 0.17	1.44 \pm 0.29	0.65 \pm 0.07	0.77 \pm 0.09
	20	1.10 \pm 0.21	0.95 \pm 0.14	1.02 \pm 0.24	1.00 \pm 0.20	0.80 \pm 0.19
과립구 ($\times 10^3$ cells/ μ l)	10	2.99 \pm 0.44	2.83 \pm 0.39	3.67 \pm 0.40	2.80 \pm 0.30	2.23 \pm 0.10
	20	2.52 \pm 0.21	1.93 \pm 0.26	1.99 \pm 0.25**	2.43 \pm 0.12	2.38 \pm 0.37

본페로니 다중 비교 방법으로 10 주령과 비교, *; p<0.05, **; p<0.01

<114> 상기 표 7에 나타낸 바와 같이, 적혈구는 모든 군에서 수술전 (10주)과 수술후 9주간의 약물 투여후 (20주)에 전혀 변화가 없었고, 혈색소 및 적혈구용적비는 모든 군에서 수술

전과 비교해서 9주간의 약물 투여후에 감소되었으나 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$), 약물의 투여에 의한 변화는 없는 것으로 나타났다. 또한, 염증반응이나 조직의 괴사 등 면역계의 이상 유무를 판단할 수 있는 백혈구 (white blood cell; WBC), 림프구 (lymphocyte; LY), 단핵구 (monocyte; MO) 및 과립구 (granulocyte; GR)의 수를 측정한 결과 백혈구는 대조군과 쿠에르세틴 및 제니스테인의 투여군에서 수술전과 약물 투여후에 변화가 없었으나 Sham군 및 E2군에서는 수술전에 비해 약물 투여후에 감소하는 것으로 나타났으며 (각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$), 이는 난소적출 후 E2의 투여로 인한 적혈구의 감소를 나타내는 것이다. 림프구와 과립구는 E2군에서만 급격한 감소를 나타냈고 ($p < 0.01$), 단핵구는 모든 군에서 변화가 없었다. 따라서, 쿠에르세틴의 투여는 조혈기능이나 면역계에 영향을 미치지 않는 안전한 약물인 것으로 사료된다.

<115> <실험에 5> 혈장의 생화학적 검사

<116> 혈액은 신체의 상태를 그대로 반영하므로 혈장내의 여러 가지 생화학적 지표들을 검사하여 쿠에르세틴의 체내 안정성을 확인하였다. 골대사에 직접적으로 관련이 있는 알칼린 포스파타제 (alkaline phosphatase; ALP), 칼슘 및 무기인산 (inorganic phosphate)의 혈장내 농도를 검사하였고, 단백질 대사 및 근육량과 연관이 있는 혈중 요소 질소 (blood urea nitrogen; BUN)와 크레아티닌을 정량하였으며, 그밖에 폐경기 이후의 여성에서 HDL-콜레스테롤이 감소하고 LDL-콜레스테롤이 증가한다는 보고가 있어 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 수치를 측정하였다. 그 결과는 하기 표 8에 나타내었다.

<117> <표 8> 약물투여에 따른 혈장내 생화학적 지표의 변화

항목	주령	대조군	Sham	E2	쿠에르세틴	제니스테인
알카린포스파타제 (U/dL)	10	262.75±23.31	245.59±22.05	196.01±28.34	232.83±20.27	208.86±19.72
	11	265.75±22.78	215.18±20.22	195.24±27.87	226.67±23.20	212.10±17.92
	20	198.31±4.64	135.09±18.64 ##\$	123.99±22.18	156.42±13.08	127.14±9.95 ##\$
칼슘 (mg/dL)	10	10.48±0.43	10.57±0.55	10.86±0.40	10.73±0.48	10.61±0.49
	11	9.98±0.34	10.35±0.17	10.03±0.18	8.37±0.24**#	8.97±0.29#
	20	10.83±0.16	11.79±0.23*\$	11.20±0.16\$	10.26±0.19\$	10.44±0.22\$
무기인산 (mg/dL)	10	6.52±0.39	6.87±0.62	6.90±0.52	6.79±0.66	7.18±0.48
	11	6.27±0.31	6.59±0.20	6.13±0.12	6.21±0.18	6.47±0.16
	20	4.95±0.41##	6.09±0.47	5.51±0.45	5.73±0.58	5.62±0.25#
혈중 요소 질소 (mg/dL)	10	18.56±0.92	17.13±1.11	18.36±1.01	17.05±0.60	16.82±0.60
	11	18.31±0.70	16.75±0.58	17.79±0.76	18.06±0.88	18.26±0.94
	20	21.20±1.06	19.23±0.84	19.99±0.86	18.19±0.41	18.31±0.86
크레아티닌 (mg/dL)	10	0.54±0.05	0.56±0.06	0.55±0.05	0.57±0.05	0.51±0.04
	11	0.54±0.05	0.62±0.04	0.57±0.03	0.59±0.01	0.64±0.02*
	20	0.78±0.03 ##\$	0.80±0.03##	0.81±0.03 ##\$	0.82±0.04##\$	0.82±0.04##\$
총 콜레스테롤 (mg/dL)	10	72.66±5.00	79.67±1.73	76.79±2.80	77.55±5.13	85.51±5.45
	11	93.32±4.75#	79.75±2.46	95.53±4.17	85.84±3.82	91.56±3.65
	20	120.44±5.21 ##\$	88.60±4.87 **#	115.05±5.75 ##\$	107.73±2.24 ##	121.07±6.53 ##
HDL-콜레스테롤	10	53.78±2.77	52.33±2.61	52.30±2.01	53.38±3.14	61.12±3.57
	11	46.20±0.62	41.69±1.47	49.03±3.37	42.49±4.85	35.26±1.92##
	20	29.60±2.63 ##\$	22.32±2.49 ##\$	24.94±2.72 ##\$	25.13±2.78##	29.27±1.98##
LDL-콜레스테롤	10	18.88±3.15	26.63±3.04	24.49±1.63	24.17±3.13	24.39±3.63
	11	42.80±6.41##	36.30±0.63	40.50±6.17	40.85±4.88	60.47±7.04##
	20	90.84±4.27 ##\$	69.29±3.05 ##\$	88.33±4.74 ##\$	82.60±4.85 ##\$	91.80±6.57 ##\$
본페로니 다중 비교 방법으로 대조군과 비교, *, p<0.05, **, p<0.01						
본페로니 다중 비교 방법으로 10 주령과 비교, #; p<0.05, ##; p<0.01						
본페로니 다중 비교 방법으로 11 주령과 비교, \$; p<0.05, \$\$; p<0.01						

<119> 상기 표 8에서 볼 수 있듯이, ALP는 모든 군에서 주령의 증가에 따라 활성도가 감소하는 경향을 나타내었는데, 특히 Sham군과 제니스테인 투여군에서는 10주 및 11주에 비해 20주에서 크게 감소되었다 (p<0.01, p<0.05). 칼슘의 농도는 주령에 따른 변화가 크지

않았는데 대체적으로 수술전에 비해 수술후 1주째에 약간 감소하는 경향을 보이고 다시 20주에서는 증가되어 10주째와 별다른 차이가 없는 것으로 나타났다. 무기인산은 대조군에서 10주에 비해 20주에서 크게 감소되었으며 ($p<0.01$), 제니스테인 투여군에서도 10주에 비해 20주에서 감소되었다 ($p<0.05$). 그러나 Sham군, E2군 및 쿠에르세틴 투여군에서는 주령의 증가에 따른 감소의 경향은 보였지만 통계적으로는 의미가 없었다. 혈중 요소 질소는 모든 군에서 주령의 증가나 약물의 투여에 영향을 받지 않았으나, 크레아티닌은 모든 군에서 주령의 증가에 따라 증가되었다 ($p<0.01$). 총 콜레스테롤의 양 역시 모든 군에서 주령의 증가에 따라 증가되었는데 Sham군은 난소적출 실험군들 (10주와 비교하여 20주에서 $p<0.01$)에 비해 그 증가가 크지는 않았고 (10주와 비교하여 20주에서 $p<0.05$), 20주에는 대조군과 비교하여 훨씬 낮은 농도를 나타냈다 ($p<0.01$). HDL-콜레스테롤은 모든 군에서 주령의 증가에 따라 감소하였는데 10주에 비해 20주에 크게 감소되었다 ($p<0.01$). 반면에 LDL-콜레스테롤은 HDL-콜레스테롤과 반대로 주령의 증가에 따라 크게 증가하였고 ($p<0.01$) 이러한 현상은 정상군인 Sham군이나 난소적출 실험군들에서 모두 동일하게 나타났다. 따라서, 본 발명에 의한 쿠에르세틴은 골다공증의 예방 및 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

<120> <제제예 1> 시럽제의 제조방법

<121> 본 발명의 쿠에르세틴, 그의 플라보노이드 유도체 및 약학적으로 허용되는 그의 염을 유효성분 2%(중량/부피)로 함유하는 시럽은 다음과 같은 방법으로 제조한다.

<122> 쿠에르세틴의 산부가염, 사카린, 당을 온수 80 g에 용해시켰다. 이 용액을 냉각시킨 후, 여기에 글리세린, 사카린, 향미료, 에탄올, 소르브산 및 증류수로 이루어진 용액을 제조하여 혼합하였다. 이 혼합물에 물을 첨가하여 100 ml가 되게 하였다. 상기 부가염은 실시예에 의한 다른 염으로 대체시킬 수 있다.

<123> 상기 시럽제의 구성성분은 다음과 같다.

<124> 쿠에르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체·염산염 . . . 2 g

<125> 사카린 0.8 g

<126> 당 25.4 g

<127> 글리세린 8.0 g

<128> 향미료 0.04 g

<129> 에탄올 4.0 g

<130> 소르브산 0.4 g

<131> 증류수 정량

<132> <제제예 2> 정제의 제조방법

<133> 유효성분 15 mg이 함유된 정제는 다음과 같은 방법으로 제조한다.

<134> 쿠에르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체·염산염 250 g을 락토오스 175.9 g, 감자전분 180 g 및 콜로이드성 규산 32 g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160 g,

활석 50 g 및 스테아린산 마그네슘 5 g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

<135> 상기 정제의 구성성분은 다음과 같다.

<136> 쿠에르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체·염산염. . . 250 g

<137> 락토오스 175.9 g

<138> 감자전분 180 g

<139> 콜로이드성 규산 32 g

<140> 10% 젤라틴 용액

<141> 감자전분 160 g

<142> 활석 50 g

<143> 스테아르산 마그네슘 5 g

<144> <제제예 3> 주사액제의 제조방법

<145> 유효성분 10 mg을 함유하는 주사액제는 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

<146> 쿠에르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체·염산염 1 g, 염화나트륨 0.6 g 및 아스코르브산 0.1 g을 증류수에 용해시켜서 100 ml을 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30 분간 가열하여 멸균시켰다.

<147> 상기 주사액제의 구성성분은 다음과 같다.

<148> 쿠에르세틴 및 그의 플라보노이드 유도체·염산염. . . 1 g

<149> 염화나트륨. 0.6 g

<150> 아스코르브산. 0.1 g

<151> 증류수. 정량

【발명의 효과】

<152> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의한 쿠에르세틴은 종래의 골다공증 치료제인 제니스테인에 비해 조골세포의 세포증식 촉진효과 및 파골세포의 세포증식 억제효과가 뛰어나고, 체내 호르몬의 변화를 크게 유발하지 않으면서 소주골의 면적 증가효과가 더욱 높게 나타날 뿐만 아니라 부작용이 없고, 조혈기능이나 면역계에 영향을 미치지 않는 안전한 약물로 확인되어 골다공증 치료제 또는 예방제 및 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

골다공증 예방 및 치료효과를 갖는 2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5,7-트리하이드록시-4H-1-벤조피란-4-온 [2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one] [쿠에르세틴 (quercetin)] 및 그의 플라보노이드 (flavonoid) 유도체를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물.

【청구항 2】

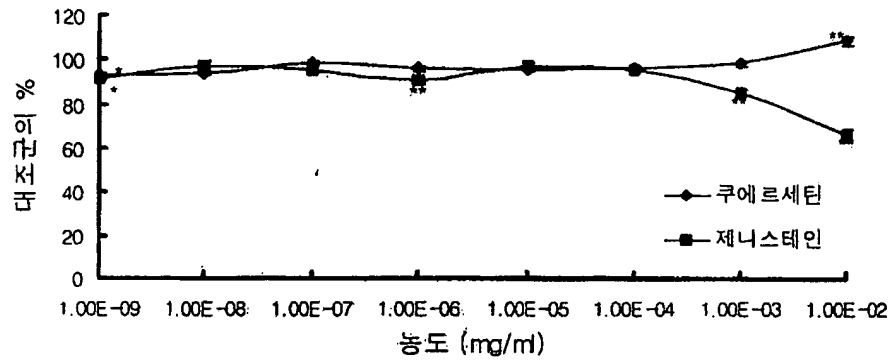
제 1항의 약학적 조성물을 이용한 골다공증 치료제 또는 예방제.

【청구항 3】

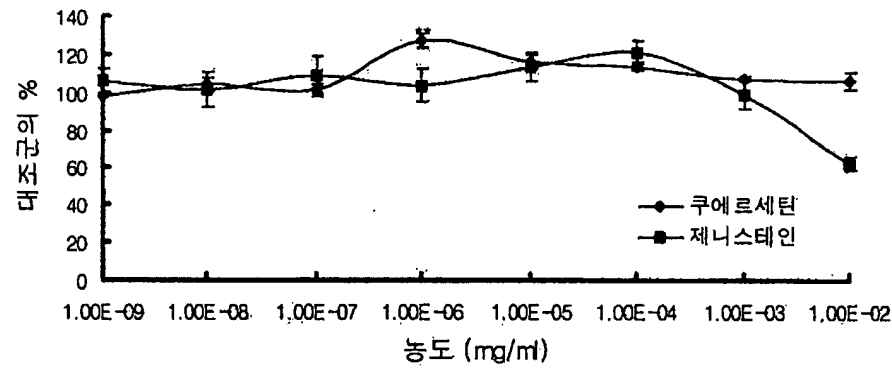
골다공증 예방 및 치료효과를 갖는 2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5,7-트리하이드록시-4H-1-벤조피란-4-온 (쿠에르세틴) 및 그의 플라보노이드 유도체를 유효성분으로 함유하는 건강식품.

【도면】

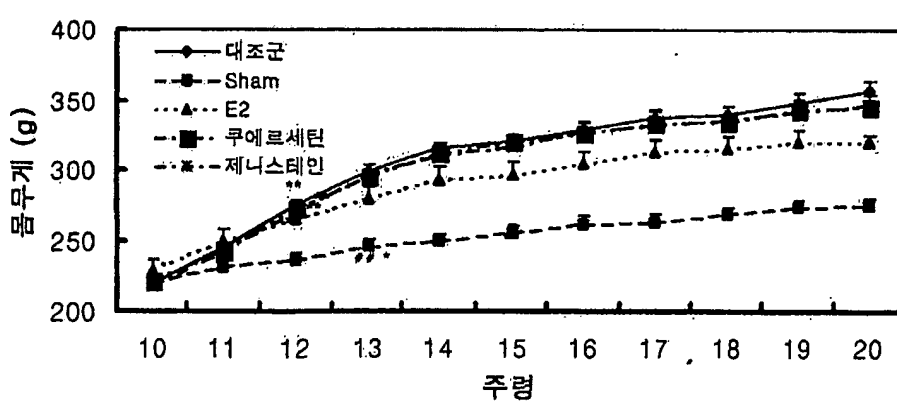
【도 1】



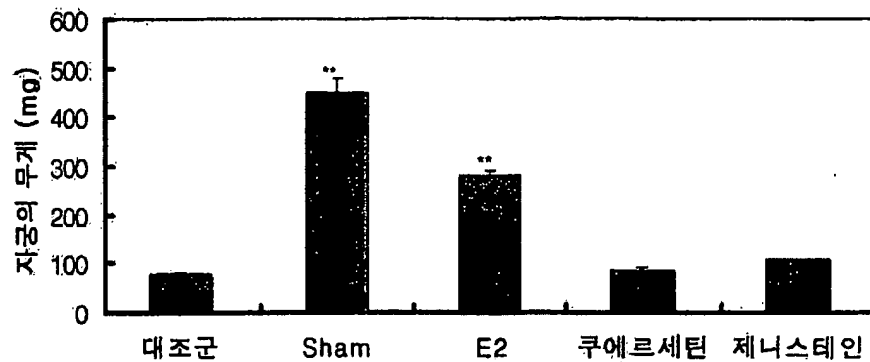
【도 2】



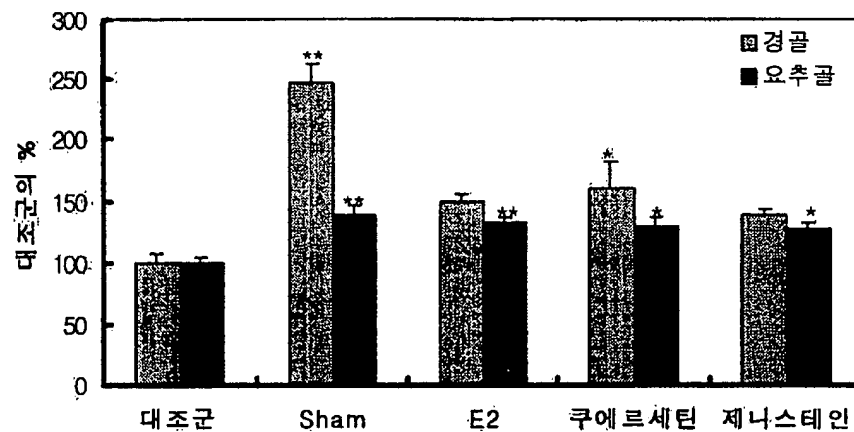
【도 3】



【도 4】



【도 5】



20000046916

출력 일자: 2001/3/22

【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2000.09.27
【제출인】	
【명칭】	한국한의학연구원
【출원인코드】	3-1998-112907-3
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	1999-053902-8
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2000-0046916
【출원일자】	2000.08.14
【심사청구일자】	2000.08.14
【발명의 명칭】	2-(3,4- 디하이드록시페닐)-3,5,7-트리하이드록시-4H-1-벤 조피 란-4-온 및 그의 플라보노이드 유도체를 골다공증 예 방 및 치 료에 사용하는 새로운 용도
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-00-0170193-72
【접수일자】	2000.08.14
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상 항목】	발명자
【보정방법】	정정
【보정내용】	
【발명자】	
【성명】	김정숙
【출원인코드】	4-1998-021013-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	하혜경
【성명의 영문표기】	HA,Hye-Kyung
【주민등록번호】	730129-2080110
【우편번호】	132-017

20000046916

출력 일자: 2001/3/22

【주소】 서울특별시 도봉구 도봉1동 서울가든아파트 1동
408호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 송계용

【성명의 영문표기】 SONG, Kye-Yong

【주민등록번호】 481002-1029431

【우편번호】 137-061

【주소】 서울특별시 서초구 방배동 922-6

【국적】 KR

【취지】 특허법시행규칙 제13조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합
니다. 대리인
이원희 (인)

【수수료】

【보정료】 0 원

【기타 수수료】 원

【합계】 0 원